UNIVERSITE PARIS - VAL DE MARNE

FACULTE DE MEDECINE DE CRETEIL

ANNEE 1975

N°23

THESE

POUR

LE DOCTORAT EN MEDECINE

(DIPLOME D'ETAT)

PAR

JEAN LOUIS LEJONC (NE LE 5 AVRIL 1948)

(INTERNE DES HÔPITAUX DE PARIS)

PRESENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE :

MORPHOLOGIE DE LA SURFACE DES LYMPHOCYTES HUMAINS. ETUDE IMMUNO-ENZYMATIQUE AU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE.

PRESIDENT : MONSIEUR LE PROFESSEUR BERNARD DREYFUS

UNIVERSITE PARIS - VAL DE MARNE

FACULTE DE MEDECINE DE CRETEIL

ANNEE 1975

THESE

POUR

LE DOCTORAT EN MEDECINE

(DIPLOME D'ETAT)

PAR

JEAN LOUIS LEJONC (NE LE 5 AVRIL 1948)

(INTERNE DES HÔPITAUX DE PARIS)

PRESENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE :

MORPHOLOGIE DE LA SURFACE DES LYMPHOCYTES HUMAINS. ETUDE IMMUNO-ENZYMATIQUE AU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE.

PRESIDENT : MONSIEUR LE PROFESSEUR BERNARD DREYFUS

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE PARIS - VAL DE MARNE

Faculté de Créteil

Année 1975 N°

THESE

POUR LE DOCTORAT EN MEDECINE

DIPLOME D'ETAT

PAR JEAN LOUIS LEJONC

Né le 5 avril 1948 à Fontenay Sous Bois (VAL DE MARNE)

TITRE : Morphologie de la surface des lymphocytes humains.
Etude immuno-enzymatique au microscope électronique.

Président de thèse : Professeur Bernard DREYFUS

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548117_0021

UNIVERSITE PARIS - VAL DE MARNE

Président : Monsieur le Professeur BEAUMONT

FACULTE DE MEDECINE DE CRETEIL

Doyen : Monsieur le Professeur RAPIN

Asseurs : Monsieur le Professeur DUVAL
Monsieur le Professeur Agrégé PORTOS

PROFESSEURS TITULAIRES et A TITRE PERSONNEL

ANATOMIE-PATHOLOGIQUE	Pr. GOUYGOU
BIOCHIMIE	Pr. GONNARD Pr. ROSA
CARDIOLOGIE	Pr. HATT
CHIRURGIE GENERALE	Pr. GERMAIN
CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE	Pr. DEBEYRE
CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE	Pr. CALEY
DERMATOLOGIE-VENEROLOGIE	Pr. TOURAINE
MEDECINE INTERNE ET HEMATOLOGIE	Pr. DREYFUS
MEDECINE INTERNE	Pr. BEAUMONT
MEDECINE INTERNE	Pr. HAZARD
NEPHROLOGIE	Pr. LAGRUE
NEUROLOGIE	Pr. BARBIZET
NEURO-CHIRURGIE	Pr. CARON
PHYSIOLOGIE	Pr. LAURENT
PNEUMOLOGIE	Pr. CHRETIEN

RADIOLOGIE THERAPEUTIQUE	Pr. PIERQUIN
REANIMATION MEDICALE	Pr. RAPIN
RHUMATOLOGIE	Pr. VILLIAUMEY
UROLOGIE	Pr. AUVERT

PROFESSEURS SANS CHAIRES ET PROFESSEURS ASSOCIES

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE	Pr. DUVAL
HEPATO-GASTRO-ENTEROLOGIE	Pr. BADER
HISTOLOGIE	Pr. CHEVREAU
PEDIATRIE	Pr. LEPERCQ
PSYCHIATRIE	Pr. BOURGUIGNON
RADIOLOGIE DIAGNOSTIC	Pr. FERRANE

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

ANATOMIE	Pr. Ag. KENESI
ANATOMIE-PATHOLOGIQUE	Pr. Ag. PINAUDEAU
ANESTHESIOLOGIE	Pr. Ag. HUGUENARD
BIOCHIMIE	Pr. Ag. BOIGNE
BIOPHYSIQUE	Pr. Ag. GALLE
	Pr. Ag. HERSZBERG
	Pr. Ag. MORETTI
CARDIOLOGIE	Pr. Ag. ACAR
	Pr. Ag. VERNANT

CHIRURGIE GENERALE	Pr. Ag. JULIEN
	Pr. Ag. LATASTE
	Pr. Ag. MEILLIERE
CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE	Pr. Ag. BOMBART Pr. Ag. GOUTALLIER
CHIRURGIE PLASTIQUE	Pr. Ag. GRELLET
	Pr. Ag. BARUCH
CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO VASCULAIRE	Pr. Ag. CACHERA
GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE	Pr. Ag. GAUTREY
HEMATOLOGIE BIOLOGIQUE	Pr. Ag. SULTAN
HEPATO-GASTRO-ENTEROLOGIE	Pr. Ag. BERTHELOT
	Pr. Ag. FOUET
	Pr. Ag. LE PARCO
	Pr. Ag. LE QUINTREC
	Pr. Ag. CATTAN
HISTOLOGIE	Pr. Ag. POIRIER
MALADIES INFECTUEUSES	Pr. Ag. LAFAIX
MEDECINE INTERNE	Pr. Ag. CACHIN
	Pr. Ag. PORTOS
	Pr. Ag. JACOTOT
MEDECINE INTERNE ENDOCRINOLOGIE	Pr. Ag. PERLEMUTER
MEDECINE INTERNE ET HEMATOLOGIE	Pr. Ag. ROCHANT
NEPHROLOGIE	Pr. Ag. WEIL
NEUROLOGIE	Pr. Ag. DEGOS
	Pr. Ag. GAUTIER
NEURO-CHIRURGIE	Pr. Ag. HURTH
NEURO-RADIOLOGIE	Pr. Ag. DEBRUN

OPHTALMOLOGIE	Pr. Ag. COSCAS
PARASITOLOGIE	Pr. Ag. HOUIN
PEDIATRIE	Pr. Ag. BARBET
PHARMACOLOGIE	Pr. Ag. TILLEMENT
PHYSIOLOGIE	Pr. Ag. SEROUSSI
RADIOLOGIE DIAGNOSTIC	Pr. Ag. VALETTE
RADIOLOGIE OPT. RADIOTHERAPIE	Pr. Ag. BAILLET
REANIMATION MEDICALE	Pr. Ag. LE GALL

DELEGUES DANS LES FONCTIONS DE M.C.A.

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE	Pr. Ag. BLOCH
HEPATO-GASTRO-ENTEROLOGIE	Pr. Ag. DHUMEAUX

Aux Pélicans

A mon Maître,

Le Professeur Bernard DREYFUS, qui me fait l'honneur de présider cette thèse

En témoignage de reconnaissance, et de profonde admiration.

A ceux qui ont contribué à ce travail :

Janine BRETON GORIUS, maître de Recherches à l'INSERM, Directeur du groupe de Microscopie Electronique de l'Unité de Recherches sur les Anémies. (INSERM U.91)

Marie Françoise GOURDIN, chercheur à l'Unité de Recherches sur les Anémies.

Felix REYES, chef de clinique-assistant,

Ils m'ont accordé leur confiance et leur amitié, dispensé leur enseignement.
Je suis heureux et fier de travailler avec eux.

Aux collaborateurs de l'INSERM qui m'ont aidé :

P. BERTHELOT et coll. (pour le spectrophotométre), I. DOCQUOIS et M. VIVIER (pour la propreté), J. GUICHARD (pour la patience), P. REBOUL (pour la photographie), M. SEGEAR (pour le secretariat), M. TITEUX (pour la gélose), H. TONTHAT.

Je remercie P. MANNONI et le personnel du C.D.T.S. du Val de Marne

Aux hommes et aux femmes qui ont accepté volontairement de subir des prélèvements douloureux pour que ce travail soit réalisé.

A mes autres maîtres dans les hôpitaux

Externat :

Monsieur le Professeur Agrégé Yves le QUINTREC

Monsieur le Professeur Agrégé Jacques LATASTE

Monsieur le Professeur Agrégé Pierre VERNANT

Monsieur le Professeur Maurice RAPIN

Internat

Monsieur le Professeur Agrégé Jean Louis PORTOS

Monsieur le Professeur Agrégé Daniel CATTAN

Monsieur le Professeur Jacques CHRETIEN

A mes amis

A J.S.

A VAKIR

"Chaque désir m'a plus enrichi que la possession, toujours fausse, de l'objet même de ce désir".

André GIDE

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION 1

MATERIEL ET METHODES 7

1. Préparation des cellules..... 7

1.1. Cellules sanguines..... 7
1.2. Cellules médullaires..... 8
1.3. Cellules thymiques..... 8

2. Préparation des anticorps..... 9

2.1. Préparation des anticorps anti-IgM et anti-IgG.. 9

2.1.1. Purification des immunoglobulines..... 9

2.1.1.1. Purification de l'IgM..... 9
2.1.1.2. Purification de l'IgG..... 10

2.1.2. Elaboration des anti-sérums..... 11

2.1.3. Isolement des anticorps..... 11

2.1.3.1. Préparation des immunoadsorbants..... 11
2.1.3.2. Immunoadsorption..... 12

2.1.4. Contrôles..... 13

2.2. Préparation de l'anticorps anti-IgA..... 15

2.3. Préparation des gamma-globulines normales de lapin..... 15

3. Couplage des anticorps..... 15

3.1. couplage des anticorps anti-mu et anti-gamma..... 15

3.2. couplage de l'anticorps anti-IgA..... 16

4. Détection des immunoglobulines de surface au microscope à transmission..... 17

4.1. application des réactifs..... 17

4.2. révèlation des anticorps couplés à la péroxydase.. 17

4.3. examen au microscope électronique 18

5. Témoins..... 18

RESULTATS..... 20

1. Cellules normales..... 20

1.1. cellules sanguines..... 20

1.1.1. Proportion de cellules marquées..... 20

1.1.2. Aspects du marquage..... 20

1.2. Cellules thymiques..... 22

1.3. Conclusions..... 22

2. Syndrome lympho-prolifératifs..... 22

2.1. Leucémie lymphoide chronique..... 22

2.1.1. lymphocytes..... 23

2.1.2. lymphoblastes..... 23

2.2. Syndrome de Sézary..... 24

3. Cellules contaminantes..... 24

4. Témoins..... 25

DISCUSSION..... 26

1. Les lymphocytes microvillositaires..... 26

2. Méthodologie..... 27

3. Les lymphocytes lisses..... 29

4. Les lymphocytes "intermédiaires"..... 30

5. Signification fonctionnelle des microvillosités..... 30

6. Leucémie lymphoide chronique..... 31

7. Syndrome de Sézary..... 32

8. Cellules contaminantes..... 33

CONCLUSION..... 34

LEGENDES DES FIGURES..... 36

REFERENCES..... 39

I N T R O D U C T I O N

L'existence de deux populations lymphocytaires est bien établie (19). Sa découverte chez l'animal a permis l'élaboration d'un concept dualiste de l'immunité. Ce dernier s'est révélé extrêmement fécond et à entièrement renouvelé la compréhension des phénomènes immunitaires. Son application à la pathologie humaine, bien que souvent hasardeuse, voire prématurée, a néanmoins bouleversé les conceptions classiques et engendré un grand nombre de travaux.

L'origine de ces idées nouvelles se trouve dans un ensemble d'expériences effectuées pour l'essentiel au cours des années 60. Parmi celles-ci, il faut citer en premier lieu les réalisations de l'école australienne (42) concernant la thymectomie néo-natale chez la souris : il a pu être ainsi démontré que l'ablation de cet organe entraine un déficit profond de l'immunité cellulaire sans affecter la possibilité de réponse humorale. Un rapprochement est alors fait avec l'effet symétrique obtenu par GLICK (25) quelques années auparavant chez l'oiseau : l'ablation de la bourse de Fabricius (organe lymphoïde annexé au cloaque) déprime la capacité de synthèse des anticorps sans diminution de l'immunité cellulaire.

Dans le même temps, GOWANS publie ses travaux sur la cinétique lymphocytaire, lesquels renouvellent complétement les idées (reçues) sur cette cellule (28). Il décrit en particulier la recirculation des petits lymphocytes du sang vers la lymphe et réciproquement, et démontre que certains lymphocytes ont une durée de vie très longue, pouvant atteindre plusieurs années.

Peu à peu se dégage le concept suivant (19). Les organes lymphoïdes sont de deux sortes ; les uns, primaires (thymus et bourse de Fabricius) sont à l'origine de deux populations lymphocytaires distinctes, dénommées T (thymo-dépendante) et B (bursodépendante). Ces lymphocytes gagnent les organes lymphoïdes secondaires (rate et ganglions) qui sont le site privilégié de l'élaboration de la réponse immunitaire. Les lymphocytes y subissent une répartition topographique qui est fonction de leur nature.

Les deux populations proviennent d'une même cellule souche qui est médullaire.

Les lymphocytes T ont une durée de vie longue et circulent en permanence, décrivant un circuit qui leur fait parcourir tout l'organisme : à partir du sang, ils passent dans le ganglion par la veine post-capillaire. Ils y occupent la zone paracorticale et la périphérie des follicules lymphoïdes. Ils sont alors en contact étroit avec les lymphocytes B et les macrophages. Ils quittent le ganglion par le lymphatique efférent et regagnent la grande circulation par l'intermédiaire du canal thoracique.

Les lymphocytes B ne circulent pas (ou peu). Ils sont dans les organes lymphoïdes secondaires (médullaire des ganglions, follicules lymphoïdes, pulpe rouge de la rate). Ils sont les précurseurs des plasmocytes et donc à l'origine de la synthèse des anticorps.

Les cellules T, en revanche, gouvernent l'immunité à médiation cellulaire (réactions d'hypersensibilité retardée, réaction du greffon contre l'hôte, rejet de greffe notamment). Ils sont indispensables également à l'édification de la réponse humorale à un grand nombre d'antigènes. Certains antigènes seulement (dits thymo-indépendants) peuvent induire la synthèse d'anticorps en l'absence de lymphocytes T.

Un des mécanismes de leur action est l'élaboration de facteurs solubles non immunoglobuliniques.

Les lymphocytes sont le support de l'expression immunitaire, mais ils ne la résument pas. La voie d'introduction de l'antigène, sa nature chimique et physique, la dose administrée, la répétition de l'immunisation peuvent modifier radicalement la réponse immunitaire (68). D'autre part, il convient d'insister sur l'importance d'autres familles cellulaires (13) : monocytes et macrophages (système réticulo-histiocytaire) dont le rôle est fondamental, tant dans la présentation de l'antigène aux lymphocytes ("antigenic processing") que dans la phase effectrice de la réponse en raison de leur pouvoir phagocytaire. Les polynucléaires interviennent également au cours de cette phase.

Des facteurs humoraux qui ne sont pas d'origine lymphoide sont également indispensable à la bonne marche d'une réponse immunitaire : complément, kinines et tous les médiateurs solubles de l'inflammation (3).

Cependant, tous ces éléments, pour fondamentaux qu'ils soient, ne possèdent pas ce caractère original qui fait du lymphocyte le chef d'orchestre de la réponse immunitaire : la spécificité.

En effet, pour chaque antigène introduit dans l'économie, un clone lymphocytaire qui lui est spécifique est apte à se développer et à engendrer une réponse cellulaire (T) et humorale (B) dont le meilleur reflet est l'étroite spécificité des anticorps. Ces clones lymphocytaires préexistent à tout contact avec l'antigène (16).

Le concept dualiste de l'immunité est aussi séduisant qu'imprécis et hypothétique. Un grand nombre de points demeurent obscurs parmi lesquels on peut relever :

- la nature et l'influence thymique différenciant les cellules souches. Deux hypothèses (qui ne sont pas mutuellement

exclusives) sont en présence (7) : l'existence d'une hormone thymique ayant pour cible les cellules souches médullaires, et/ou la nécessité d'une migration de ces dernières vers le thymus pour acquérir la caractéristique T.

- L'existence d'un équivalent à la bourse de Fabricius chez les mammifères. Les formations lymphoides du tube digestif ont longtemps été candidates (18). On se borne volontiers à constater que la différenciation en cellules B à partir des cellules souches médullaires échappe au thymus (ce qui permet de ne pas modifier la nomenclature, B signifiant bone marrow derived).

- La cinétique des cellules souches et la régulation de leur pool (19).

- Le mécanisme de la coopération entre cellules B et T d'une part (34, 17, 43) entre lymphocytes et macrophages d'autre part (22).

- L'existence éventuelle d'une troisième sous population lymphocytaire (24) ou d'états de transition entre cellules T et B (21, 53).

- La nature du récepteur de membrane lymphocytaire pour l'antigène, certainement immunoglobulinique pour les cellules B, hypothétique pour les T (44).

L'application d'un concept aussi lacunaire à la pathologie humaine peut sembler audacieux ; elle s'est pourtant révélée extrêmement fructueuse, tout particulièrement dans les domaines des déficits immunitaires et des syndromes lympho-prolifératifs (8, 49, 57, 61).

Ces travaux ont impliqué la recherche de marqueurs susceptibles de permettre l'identification des populations lymphocytaires chez l'homme.(33). C'est ainsi que :

- La capacité de former une rosette avec les globules rouges de mouton est une propriété exclusive du lymphocyte T.

-Les lymphocytes B, en revanche, sont pourvus de plusieurs récepteurs de membrane identifiables (pour la fraction 3 du complément, pour le fragment Fc des immunoglobulines G) et surtout, portent des immunoglobulines de membrane facilement détectables.

Ce dernier marqueur est apparu le plus fiable et surtout le plus maniable. Il a permis les résultats les plus reproductibles grâce à l'utilisation d'anticorps anti-immunoglobulines couplés à un fluorochrome (48).

C'est en mettant à profit l'existence de ces marqueurs lymphocytaires que l'on a pu affirmer la nature B des accumulations de lymphocytes au cours de la leucémie lymphoide chronique et de la maladie de Waldenström (49, 8, 62), préciser la classification des déficits immunitaires (61), remarquer l'originalité du syndrome de Sézary (accumulation de lymphocytes T) au sein des syndromes lympho-prolifératifs. (15).

Chez le sujet normal, les proportions des lymphocytes T et B circulants sont respectivement de 70-80% contre 15-20% (48).

Cependant, jusqu'à présent, aucune différence morphologique consistante n'a pu être établie entre les deux populations lymphocytaires, que ce soit au microscope optique ou électronique (10, 72) ou à l'aide de techniques sophistiquées utilisant des anticorps marqués en autoradiographie (45) à l'aide de virus (31), de ferritine (12) ou de péroxydase (27, 40).

Nous pensons que ce type d'étude morphologique méritait d'être reprise par une technique modifiée, d'autant que des travaux récents au microscope à balayage (47) signalent une différence dans la morphologie de la surface des lymphocytes T et B.

Nous avons donc entrepris un ensemble de manipulations dans le but d'observer les lymphocytes humains immédiatement fixés après leur recueil au microscope électronique (53). La démonstration directe du caractère B ou non B des cellules examinées repose sur la présence ou l'absence d'immunoglobulines de surface révélées par un anticorps monospécifique couplé à la péroxydase et donc visible au microscope électronique après application de diamino-benzidine (29).

MATERIEL ET METHODES

Le matériel cellulaire utilisé est constitué de cellules sanguines et médullaires réparties comme suit :

- leucocytes sanguins de huit individus normaux, de sept patients souffrant de leucémie lymphoide chronique non traités et d'un sujet porteur d'un syndrome de Sézary.

- cellules de moelle osseuse d'un sujet normal et d'un malade atteint de leucémie lymphoide chronique.

1. PREPARATION DES CELLULES

Les échantillons cellulaires sont fixés avant l'application des réactifs, ils sont susceptibles ainsi d'être conservés quelque temps en tampon à +4°C avant la manipulation et entre les différentes étapes de celle-ci.

1.1. Cellules sanguines

Le sang est recueilli par ponction veineuse dans un tube hépariné. Une sédimentation d'une heure à température du laboratoire est réalisée immédiatement.

La couche leucocytaire est alors recueillie. Les cellules sont centrifugées (200 g) puis lavées trois fois dans la solution saline de Hanks à température du laboratoire. Elles sont ensuite

fixées par mise en suspension dans une solution de glutaraldéhyde (TAAB laboratories), de 1,25% en tampon phosphate pH 7,4, 0,15 M (tampon de Sörensen). Après 30 min. de fixation à +4°C, le culot cellulaire est lavé deux fois en tampon Sörensen.

1.2. Cellules médullaires

Le suc médullaire est aspiré par ponction iliaque à l'aide du trocart de Mallarmé. Il est recueilli dans la solution saline de Hanks héparinée (1 goutte de liquémine Roche pour 50 ml de solution saline).

Les grains de moelle sont isolés dans un verre de montre, puis dissociés par pipettage énergique et persévérant dans la solution de Hanks.

Les cellules nucléées sont alors séparées des goutellettes graisseuses par lavages répétés alternant avec des centrifugations de cinq minutes à 200 g.

La fixation par le glutaraldéhyde est effectuée comme pour les cellules sanguines.

1.3. Cellules thymiques

Un thymus humain a été prélevé sur un sujet de cinq ans à l'occasion d'une thoracotomie indiquée pour cure chirurgicale d'une cardiopathie congénitale.

Le tissu est dissocié mécaniquement dans la solution saline de Hanks, puis les cellules sont concentrées par centrifugations répétées (200 g.) à température du laboratoire. Après deux lavages supplémentaires, le culot cellulaire est fixé par le glutaraldéhyde comme précédemment.

2. PREPARATION DES ANTICORPS

2.1. Préparation des anticorps anti-IgM et anti-IgG

Les antisérums réagissant spécifiquement avec les immunoglobulines M et G respectivement sont élaborés chez le lapin à partir d'immunoglobulines monoclonales humaines ; l'isolement des anticorps est réalisé par immunoadsorption.

2.1.1. Purification des immunoglobulines

L'obtention d'immunoglobulines purifiées a lieu à partir de sérums de patients souffrant de myélome multiple avec IgG monoclonale circulante et de maladie de Waldenström.

De tels sérums sont disponibles en grande quantité en raison des plasmaphérèses thérapeutiques.

2.1.1.1. Purification de l'IgM

L'IgM a été isolée du sérum d'un malade atteint de maladie de Waldenström par la méthode de MASSEYEFF et coll. (39). De même que pour la majorité des techniques utilisées actuellement, le temps essentiel est la filtration sur gel de dextrane mettant à profit le poids moléculaire élevé de la molécule (900 000).

Bien entendu, cette gel-filtration doit être précédée de l'élimination des molécules non immunoglobuliniques de poids moléculaire voisin c'est à dire essentiellement la β-lipoprotéine et l'α-2-macroglobuline.

La méthode comprend donc trois temps :

- en premier lieu, l'élimination de la β-lipoprotéine qui est précipitée par le sulfate de dextrane à 10% (ajouté au sérum brut), le surnageant est recueilli.

- le deuxième temps est la précipitation des euglobulines. En effet, l'IgM est une englobuline typique, qui est précipitée par les solutions de faible force ionique. L'acide borique (7,5 g/l) est utilisé, qui permet une précipitation plus rapide et plus sélective des euglobulines que le tampon phosphate utilisé classiquement. Le précipité est repris dans une solution de tampon Tris.

- la dernière phase de la purification est la filtration sur gel de dextrane (Séphadex G200, Pharmacia Chemicals). Deux pics surviennent, dont le premier contient exclusivement l'IgM. Il convient d'élaguer confortablement vers le second pic pour éviter les contaminations.

2.1.1.2. Purification de l'IgG

La purification de l'IgG a été réalisée par la méthode de FINE et STEINBUCH (23) à partir du sérum d'un myélomateux.

Cette méthode met à profit la solubilité de l'IgG et de l'IgA dans l'acide caprylique, dont sont dépourvu les autres protéines sériques. Elle a l'avantage sur les techniques classiques utilisant exclusivement la chromatographie sur résine échangeuse d'ions d'autoriser le fractionnement d'une grande quantité de sérum en une seule manipulation.

Trois temps sont nécessaires :

- tout d'abord, l'albumine et la majeure partie des globulines non immunoglobuliniques sont éliminées par relargage (sulfate d'ammonium à 40%). Le précipité est repris dans du tampon phosphate tamponné à pH 7,4 (PBS) puis dialysé.

- ensuite est réalisée la solubilisation dans l'acide caprylique (6,8%, pH 4,8). Le surnageant est recueilli et dialysé.

- ces deux premières étapes permettent l'obtention d'un mélange d'IgG et d'IgA. Celle-ci est en faible quantité relativement à celle-là, car il s'agit initialement d'un sérum myélomateux, pauvre en immunoglobulines hétérogènes.

Cette IgA contaminante est éliminée par absorption sur une résine échangeuse d'ions (diéthylaminoethyl-cellulose) équilibrée en tampon acétate 0,015 M, pH 5,7.).

Les solutions d'IgM et d'IgG sont concentrées à 10 mg/ml sur membrane Diaflo et conservées à -20°C.

2.1.2. Elaboration des antisérums

Le protocole suivant (27) est appliqué sur des lapins pour l'élaboration des antisérums anti-IgM et anti-IgG : une première immunisation intra-dermique (2 mg d'antigène dans l'adjuvant complet de Freund) est suivie de deux rappels à huit jours d'intervalle, deux mois plus tard (intra-musculaires et intra-veineux). La saignée mortelle a lieu huit jours après le dernier rappel.

2.1.3. Isolement des anticorps

Des antisérums bruts sont isolés par immunoadsorption les anticorps monospécifiques anti-chaine lourde mu et anti-chaine lourde gamma.

2.1.3.1. Préparation des immunoadsorbants

Les immuadsorbants sont fabriqués avec les immunoglobulines purifiées (cf. 2.1.1.) en appliquant la technique d'AVRAMEAS et TERNINCK (5).

Le principe de cette méthode est d'induire une copolymérisation de l'immunoglobuline et d'albumine bovine (BSA) par le glutaraldéhyde. Cette molécule possède deux radicaux aldéhydiques pouvant lier ensemble les protéines en se combinant aux radicaux aminés libres (essentiellement ceux portés par la lysine). L'albumine bovine n'est qu'un support destiné à obtenir un immunoadsorbant de volume suffisant, tout en épargnant les quantités d'immunoglobuline pure disponible.

La réalisation de la polymérisation est simple : elle est obtenue par mise en solution des protéines (100 mg d'immunoglobuline et 400 mg de BSA) dans 10 ml de tampon acétate 0,2 M pH 5, à laquelle sont ajoutés progressivement en agitant 2 ml de glutaraldéhyde à 2,5% ; un gel se forme en une demi-heure à température du laboratoire, lequel est laissé trois heures au repos.

Il suffit ensuite d'homogénéiser ce gel en le passant à l'aide d'une seringue à travers une aiguille de 1,5 mm de diamètre.

Des grains sont obtenus qui sont lavés plusieurs fois dans le PBS pH 7,4, acidifiés par un tampon acide chlorhydrique-glycine pH 2,8, neutralisés par le phosphate di-potassique molaire, puis conservés en tampon PBS pH 7,4 jusqu'à l'utilisation.

Deux immunoadsorbants ont été réalisés par cette méthode, un avec l'IgG, l'autre avec l'IgM.

2.1.3.2. Immunoadsorption

10 à 20 ml de sérum de lapin (cf. 2.1.2.) sont incubés en agitation modérée pendant une heure à température du laboratoire avec l'immunoadsorbant. Des lavages répétés du polymère en PBS réfrigéré sont effectués, afin d'éliminer toutes les protéines non spécifiquement adsorbées.

Ensuite, les anticorps fixés sur l'immunoadsorbant en sont élués par un tampon acide (acide chlorhydrique glycine pH 2,8 et pH 2,2), neutralisés, dialysés et concentrés à 5 mg/ml sur membrane Diaflo.

L'immunoadsorbant est neutralisé puis conservé à +4°C en tampon PBS jusquà un usage ultérieur. Un polymère peut être utilisé de très nombreuses fois sans perdre sa capacité d'adsorption (nous purifions des anticorps anti-mu sur le même polymère IgM depuis 3 ans).

Ainsi le passage d'un antisérum anti IgG ou anti-IgM sur un polymère préparé avec une immunoglobuline homologue permet d'obtenir un anticorps pur anti IgM ou anti IgG.

Pour sélectionner les anticorps anti-chaîne lourde, on réalise une incubation avec un polymère préparé à l'aide d'une immunoglobuline différente ; les anticorps anti-chaîne légère sont adsorbés sur l'immunoadsorbant, les anticorps anti chaîne lourde étant au préalable récupérés dans le surnageant.

Donc la préparation d'anticorps anti-mu nécessite deux temps :

- en premier lieu, l'isolement de l'anti-IgM de l'antisérum de lapin par élution sur polymère IgM.

- ensuite, l'incubation de cet anti-IgM sur polymère IgG et la récupération du surnageant.

Une procédure symétrique permet de purifier l'anti gamma à partir de l'antisérum anti-IgG.

2.1.4 Contrôles

Les contrôles de la pureté des anticorps sont réalisés par immunoélectrophorèse et double diffusion d'Ouchterlony.

Les critères exigés pour la pureté des immunoglobulines (cf. 2.1.1.) sont les suivants :

- un seul arc de précipitation contre un antisérum anti-sérum humain normal (anti-SHN)

- un seul arc de précipitation contre un antisérum dirigé contre la chaîne lourde correspondante.

- aucun arc de précipitation contre un antisérum dirigé contre les autres chaines lourdes.

- aucun arc de précipitation contre les anti-chaînes légères.

Les antisérums anti-SNH, anti IgG, anti IgM, anti-IgA, anti-kappa, anti-lambda, anti-mu et anti-gamma proviennent du Centre de Transfusion Sanguine de Rouen (Dr. ROPARTZ). Les flèches sont fournies par les laboratoires ROBINWOOD.

Les critères de pureté concernant les anticorps anti-mu et anti-gamma sont :

- un seul arc de précipitation contre l'immunoglobuline homologue purifiée

- un seul arc de précipitation contre le sérum humain normal.

- aucun arc de précipitation contre une immunoglobuline d'une classe différente.

Pour ces contrôles, les antigènes utilisés sont des fractions immunoglobuliniques "purifiées" fournies par le Centre National de Transfusion Sanguine (Pr. J.P. SOULIE) (IgG et IgA). L'IgM utilisée est celle que nous préparons (cf. 2.1.1.1.).

Dans tous les cas, différentes dilutions des anticorps et des antigènes sont appliquées afin de ne pas méconnaitre d'éventuels contaminants présents en faible quantité.

2.2. Préparation de l'anticorps anti-IgA

L'anticorps anti IgA nous a été gentiment donné par le Pr. Agr. Ph. DRUET. Il est préparé par la méthode suivante (60).

Un antisérum riche en anti-IgA est élaboré par immunisation d'une chèvre par du colostrum humain.

Ce sérum est épuisé de ses contaminants par passages successifs sur deux immunoadsorbants, l'un d'IgG humaine, l'autre fait à partir d'un sérum de sujet déficient en IgA.

Les anticorps anti IgA sont recueillis par élution après incubation du surnageant avec un polymère réalisé à l'aide d'un sérum de sujet porteur d'une cirrhose alcoolique (sérum très riche en IgA).

2.3. Préparation des gamma globulines normales de lapin

Les gamma globulines normales de lapin ont été isolées par relargage (sulfate d'ammonium à 40%) d'un pool de sérums de lapins normaux.

3. COUPLAGE DES ANTICORPS

3.1. Couplage des anticorps anti-mu et anti-gamma

Le couplage des anticorps anti-mu et anti-gamma monospécifiques (cf. 2) est effectué par la méthode d'AVRAMEAS et TERNINCK en deux temps (6). La péroxydase de raifort Sigma VI est utilisée.

Cette méthode en deux temps a pour avantage sur la méthode en un temps indroduite auparavant par ces mêmes auteurs, de permettre la réalisation de conjuguats comprenant une molécule de péroxydase et une seule molécule d'anticorps, sans production de polymères.

Le premier temps consiste en une "activation" de la péroxydase (15 mg) par simple mélange avec le glutaraldéhyde (0,2 ml à 1,25%, pH 5,8). Il ne se produit pas de polymérisation de la péroxydase. Il est vraisemblable qu'une molécule de péroxydase ayant réagi avec un des deux résidus aldéhydiques du glutaraldéhyde acquière une configuration rendant impossible la liaison du second résidu avec une autre molécule de péroxydase.

Après vingt quatre heures de contact, le gluraldéhyde en excès est éliminé par dessalage sur une colonne de gel de Dextrane (Sephadex G25). Les fractions contenant la péroxydase activée sont aisément identifiées par leur coloration brune.

Elles sont recueillies, éventuellement concentrées à 1 ml, et mises en présence des anticorps (1 ml à 5 mg/ml). Le mélange est tamponné (tampon carbonate 0,1 M pH 9,5) et laissé au repos quelques jours à +4°C.

La péroxydase en excès est éliminée par relargage (sulfate d'ammonium à 50%). Le précipité est repris en PBS pH 7,4 et dialysé avant l'utilisation.

Les gamma globulines normales de lapin sont couplées à la péroxydase par cette même méthode en deux temps.

3.2. Couplage de l'anticorps anti IgA

L'anticorps anti IgA est couplé à la péroxydase par la méthode d'AVRAMEAS en un temps (4) dans laquelle l'anticorps, la péroxydase et le glutaraldéhyde sont mis en solution ensemble,

ce qui occasionne la formation de polymères comprenant une molécule de péroxydase et plusieurs molécules d'anticorps. De plus, des molécules libres de péroxydase sont présentes .

4. DETECTION DES IMMUNOGLOBULINES DE SURFACE AU MICROSCOPE A TRANSMISSION

4.1. Application des réactifs

Les suspensions de cellules fixées sont centrifugées et le culot cellulaire est mis en suspension à 3% dans le tampon PBS.

1 ml de cette suspension est incubé avec les anticorps couplés (1 mg/ml) pendant une heure à température du laboratoire puis les cellules sont lavées deux fois dans un grand volume de tampon PBS réfrigéré.

Une fixation par le glutaraldéhyde est faite (1,25% pendant 15 min.) afin d'inhiber toute élution des anticorps. Plusieurs lavages sont de nouveau pratiqués.

4.2 Révélation des anticorps couplés à la péroxydase

La technique de GRAHAM et KARNOVSKY (29) légèrement modifiée est utilisée.

Le culot cellulaire est incubé avec le mélange habituel : diaminobenzidine (10 mg), tampon Tris-HCl 0,05 M pH 7,6 (10 ml) eau oxygénée à 1% (0,1 ml), ajusté au pH 7,6. La péroxydase catalyse le transfert d'électrons de la diaminobenzidine au péroxyde d'oxygène. Le diaminobenzidine en s'oxydant forme un polymère amorphe insoluble au lieu d'action de l'enzyme (et non à distance).

Ce polymère est opaque aux électrons et osmiophile. Après une heure d'incubation à l'obscurité, deux lavages rapides en tampon Sörensen sont faits, puis les cellules sont fixées par l'acide osmique à 1% (en tampon Sörensen) pendant une demi heure à +4°C et enfin lavées dans l'eau distillée.

4.3. Examen au microscope électronique (10)

La deshydratation est réalisée par la méthode des alcools gradués (incubations successives de dix minutes dans l'alcool éthylique à 70°, à 90°, puis deux fois dans l'alcool absolu). Des dilutions moindres sont utilisées par l'opérateur pour sa rehydratation personnelle. Suivent deux bains dans l'oxyde de propylène, puis l'incubation en résine Epoxy selon la technique habituelle : réalisation d'un premier bain du mélange oxyde de propylène. Epon, puis inclusion dans l'Epon qui est laissé à polymériser 18 heures à +60°C.

Les coupes ultrafines sont effectuées sur un ultramicrotome Reichert et examinées au microscope électronique Philips EM 300.

La majorité des coupes ne sont pas post-colorées par l'acétate d'uranyl et/ou le citrate de plomb, afin de faciliter l'interprétation des marquages membranaires.

5. TEMOINS

Les témoins suivants ont été réalisés :

- en premier lieu, le remplacement des anticorps couplés par des gamma globulines normales de lapin (1 mg/ml).

- ensuite, l'incubation de lymphocytes de leucémie lymphoide chronique portant une immunoglobuline de surface connue, avec l'anticorps inapproprié pour obtenir un marquage.

- enfin, inhibition spécifique du marquage par exposition préalable des cellules à un anticorps non couplé.

Du fait que les anticorps anti IgA sont utilisés sans élimination de la péroxydase libre, des témoins ont été effectués comportant l'incubation des cellules fixées avec la péroxydase seule en excès (3 mg/ml en PBS).

R E S U L T A T S

1. CELLULES NORMALES

1.1. Cellules sanguines

1.1.1. Proportion des cellules marquées

Un marquage de membrane est visible sur 15 à 20% des lymphocytes sanguins incubés avec un mélange d'anti gamma et d'anti mu (mélange dit anti-immunoglobuline). En employant les anticorps monospécifiques, on constate une importante prédominance des lymphocytes porteurs d'IgM de membrane, confirmant ainsi nos résultats préliminaires (52).

Les lymphocytes portant une IgA de surface sont extrêmement rares. Quoiqu'il en soit, la réalisation d'une étude quantitative n'est pas le but de ce travail.

1.1.2. Aspects du marquage

Dans tous les échantillons, le marquage est continu, dense, soulignant la membrane cytoplasmique. Jamais n'a été observé de marquage ponctuel en dépôt.

L'aspect le plus remarquable des lymphocytes marqués et le caractère villositaire de leur surface cytoplasmique. En revanche, les lymphocytes exempts de marquage ont une surface lisse et régulière (Fig. 1 et 2).

Ces microvillosités sont nombreuses et habituellement réparties harmonieusement tout autour de la cellule marquée, leur longueur variant avec le plan de section. Des sections transversales de ces microvillosités sont fréquemment observées au contact même ou à quelque distance de la membrane cellulaire.

Beaucoup plus rarement est observée une concentration des microvillosités marquées à un pôle de la cellule, la membrane restante étant faiblement marquée. Ce fait permet de corréler davantage le caractère microvillositaire et la présence d'immunoglobuline de surface. (Fig. 4).

Cependant, cette dualité cellules lisses-cellules villeuses n'est pas absolue (Fig. 3).

En premier lieu, certains lymphocytes dépourvus de marquage possèdent quelques digitations courtes et espacées, mais n'affectant pas la forme globale régulière de la membrane cytoplasmique.

De plus, il est frappant que les cellules dont le marquage de membrane est modéré possédent peu de microvillosités : ces lymphocytes intermédiaires sont visibles dans tous les échantillons de sang normal, avec l'anti-gamma comme avec l'anti-mu.

Ainsi, il est tentant d'établir un parallèlisme entre l'importance des microvillosités et la quantité d'immunoglobulines de surface présentes.

1.2. Cellules thymiques

Les cellules thymiques incubées avec l'anti-mu ou l'anti-gamma ne sont jamais marquées. La majorité de ces cellules apparaissent comme des petits lymphocytes, plus rares sont les lymphocytes de plus grande taille.

Toutes ces cellules ont une surface régulière et lisse, les microvillosités sont rares, espacées et de faible taille (Fig. 11).

1.3. Conclusions

Il résulte de ces manipulations sur cellules normales qu'une séparation des lymphocytes en deux sous-populations peut être d'emblée réalisée en rapport à la morphologie de leur surface.

Il n'a pas été remarqué d'autres différences ultrastructurales, en particulier quant aux organelles intracellulaires.

Cependant, en l'absence de post-colorations, d'éventuelles différences fines ont pu échapper.

2. SYNDROMES LYMPHO-PROLIFERATIFS

2.1. Leucémie lymphoide chronique

Cinq échantillons provenant de malades atteints de leucémie lymphoide chronique ont été étudiés à l'aide d'anticorps monospécifiques : quatre sont composés de lymphocytes porteurs exclusivement d'IgM de surface, le cinquième d'IgG (prélèvement médullaire).

Trois échantillons supplémentaires ont été manipulés avec des anticorps anti-immunoglobuline.

2.1.1. Lymphocytes

Des variations manifestes dans l'intensité du marquage sont observées d'un échantillon à l'autre (facilement objectivées par l'examen d'un grand nombre de coupes au faible grossissement). Le marquage est habituellement faible. Lorsqu'il est plus net, les immunoglobulines de surface sont détectées sur pratiquement toutes les cellules (Fig. 8).

En outre, des variations dans l'intensité du marquage sont remarquables parmi les lymphocytes d'un même échantillon marqués par des anticorps monospécifiques (Fig. 9). Ces variations individuelles (qui incluent quelques cellules négatives) sont très nettes au sein des prélèvements globalement faiblement marqués.

Enfin, comme dans le sang normal, une relation s'établie entre la morphologie de la surface des lymphocytes et leur charge en immunoglobuline, les cellules les plus villositaires étant les plus fortement marquées.

2.1.2. Lymphoblastes

Deux échantillons sanguins de leucémie lymphoide chronique (avec IgM de surface) sont riches en cellules plus volumineuses, possèdant les caractéristiques ultrastructurales d'un noyau jeune (grand nucléole, peu ou pas d'hétérochromatine).

Ces éléments facilement identifiables au microscope photonique et nommés "lymphoblastes", représentent 10 et 30% des lymphocytes circulants, respectivement. Au microscope électronique elles possèdent une membrane lisse, dépourvue de microvillosités ou n'en possédant qu'un petit nombre, mais pourvue d'IgM de surface facilement détectable. (Fig. 10).

Cette dernière donnée apparait donc comme divergente, rapportée à celles découlant de l'examen des cellules normales et des leucémies lymphoides chroniques habituelles.

2.2. Syndrome de Sézary

Chez un patient souffrant de syndrome de Sézary, la moitié des leucocytes sanguins sont anormaux, facilement reconnus grâce aux critères ultrastructuraux classiques dont le plus évident est l'aspect cérébroide du noyau (38a). Le cytoplasme est riche en nombreuses vésicules claires, en corps multivésiculaires et en lysosomes denses.

Parfois, la membrane présente un segment villositaire. Aucun marquage de ces cellules n'a pu être obtenu avec les différents anticorps, cependant que les rares lymphocytes villositaires typiques présents étaient marqués comme à l'habitude (Fig. 6).

3. CELLULES CONTAMINANTES

Les lymphocytes n'ayant pas été isolés de la couche leucocytaire, d'autre cellules sanguines sont facilement observées : hématies, monocytes, granulocytes, qui possèdent une activité péroxydasique endogène.

Aucune hématie n'est marquée. Il en est de même de la plupart des cellules granuleuses (Fig. 4, 6).

Cependant, quelques granulocytes et une quantité variable de monocytes sont marqués, essentiellement au niveau de leurs projections digitiformes (Fig. 5). Ce fait est observable que les monocytes soient ou non contigus à un lymphocyte marqué. En revanche, certains monocytes contigus peuvent être dépourvus de marquage (Fig. 7).

4. TEMOINS

L'incubation des cellules (sang normal ou leucémie lymphoide chronique) avec des gamma globulines normales de lapins couplées n'a jamais donné lieu à aucun marquage.

Il est remarquable que les leucocytes contaminants soient également exempts de marquage.

D'autre part, les lymphocytes de leucémie lymphoide chronique marqués par un anticorps monospécifique donné, ne le sont pas par les autres, ce qui démontre au niveau cellulaire la pureté de nos anticorps.

Enfin, l'inhibition du marquage par un anticorps "froid" a été réalisée sur le sang normal (avec l'anti-immunoglobuline) et sur le sang de leucémie lymphoide chronique (avec les anticorps monospécifiques).

La majorité des lymphocytes sont dénués de tout marquage après exposition à la péroxydase de Raifort seule.

Néanmoins, sur quelques coupes, de petits précipités minces et discontinus sont visibles le long de la membrane (Fig. 9). Ce marquage artefactuel, facilement distingué du marquage spécifique, n'est jamais visible avec l'utilisation des conjuguats (dénués de péroxydase libre).

D I S C U S S I O N

Ces constatations permettent d'établir une corrélation entre l'hétérogéneité fonctionnelle des lymphocytes humains et la morphologie de leur membrane cytoplasmique.

1. LES LYMPHOCYTES MICROVILLOSITAIRES

Elles corroborent parfaitement les conclusions de POLLIACK et coll. (47). Ces auteurs ont examiné les lymphocytes humains au microscope à balayage, procédé qui permet une excellente représentation de la surface cellulaire (10), particulièrement avec une nouvelle méthode de préparation des spécimens (procédé de séchage dit "du point critique").

Après examens de diverses populations cellulaires, ils établissent une relation frappante entre l'aspect villositaire ou lisse des lymphocytes et leur nature B ou T respectivement. Les marqueurs utilisés sont habituels, mais la méthode ne permet pas de visualiser directement les immunoglobulines de surface des cellules villositaires.

L'originalité de notre travail a été d'apporter cet argument direct par l'immuno-péroxydase, après avoir constaté que les particularités de la surface lymphocytaire remarquées au microscope à balayage se retrouvent au microscope électronique

à transmission, sous réserve de fixer les cellules immédiatement après leur prélèvement. Des résultats préliminaires indiquent également que les lymphocytes normaux médullaires pourvus d'immunoglobuline de surface ont également une surface villositaire.

2. METHODOLOGIE

Rappelons que jusqu'à ces travaux, aucune différence morphologique notable n'avait pu être établie entre les différentes sous-populations lymphocytaires (cf. Introduction).

Cependant, toutes les manipulations qui avaient été réalisées dans ce sens avaient concerné des cellules vivantes ; or il est clairement démontré que l'application de réactifs (anticorps, antigène, lectines) sur une cellule lymphoide induit une "activation" de la membrane plasmique, elle même entrainant une endocytose du réactif et une redistribution des structures membranaires ("capping") (55, 64, 67).

De telles expériences ne peuvent donc prétendre étudier la morphologie des lymphocytes normaux, bien qu'elles soient habituellement réalisées sur un matériel réfrigéré, le refroidissement diminuant mais ne supprimant pas l'endocytose (55). De plus, il est prouvé que la réfrigération est susceptible de réduire significativement la richesse en microvillosités lymphocytaires (38).

En connaissance de cause, nous avons appliqué des anticorps anti-immunoglobulines couplés à la péroxydase sur des lymphocytes vivants : dans ces conditions, nous avons observé une endocytose du marqueur avec internalisation de la membrane pouvant faire perdre tout caractère villositaire à la cellule (51).

En revanche, la fixation préalable permet d'observer des lymphocytes à la membrane non modifiée. Il est déjà établi que l'utilisation du glutaraldéhyde n'affecte pas la détection des motifs antigéniques de surface des lymphocytes (69) ou des cellules de la lignée érythrocytaire du sang et de la moelle humains (54). Ceci a été également démontré dans d'autres systèmes (58, 36).

De même, les immunoglobulines polymérisées par le glutaraldéhyde conservent leur antigénicité et peuvent être utilisées en tant qu'immunoadsorbant (5). Cet aldéhyde est donc un fixateur adéquat pour préserver l'antigénicité des immunoglobulines de surface des lymphocytes.

Les témoins utilisés autorisent l'exclusion de toute adsorption non spécifique des anticorps couplés par le biais de résidus aldéhydiques libres résiduels à la surface de la cellule fixée.

Le fait d'avoir appliqué les anticorps couplés sur des cellules fixées rend compte du caractère continu du marquage; d'autres auteurs ont observé par des méthodes identiques un marquage d'aspect différent car discontinu, en travaillant sur cellules vivantes (45, 59, 66, 31, 12). Il semble que ce type de distribution du marqueur soit artéfactuel, en rapport avec le rassemblement des motifs antigéniques par les anticorps divalents (20) ; ce phénomène est passif et n'induit que secondairement les phénomènes actifs de redistribution membranaire et d'endocytose (63). Il est remarquable à ce propos que l'application d'anticorps monovalents (Fab) couplés à la ferritine entraîne un marquage continu (20). En effet, il est bien démontré que ces anticorps ne peuvent induire de redistribution des antigènes membranaires (63). Néanmoins, l'utilisation d'anticorps couplés à la ferritine laisse persister des espaces membranaires non marqués, ce qui n'est pas le cas avec la péroxydase. Les raisons de ces différences ont été clairement discutées par BRETTON et coll. (14).

Enfin, bien que notre méthode ne soit pas quantitative, elle permet de remarquer la prédominance de l'IgM en tant qu'immunoglobuline de surface lymphocytaire, ce qui concorde avec la plupart des travaux quantitatifs menés en immunofluorescence (62, 48, 49, 33, 24). Il est établi que les immunoglobulines de surface des lymphocytes sont produites par la cellule et non passivement adsorbées du sérum (62).

3. LES LYMPHOCYTES LISSES

En démontrant le caractère microvillositaire de la surface des lymphocytes B, nos observations suggèrent fortement la nature T des lymphocytes pourvus d'une surface lisse.

Plusieurs équipes ont entrepris l'examen au microscope à balayage des rosettes spontanées lymphocytaires obtenues avec les globules rouges de mouton.

Les résultats sont contradictoires, les cellules T apparaissant tantôt plus lisses (37), tantôt plus villeuses (35) que les lymphocytes B.

Ces résultats doivent sans doute être interprétés avec prudence, l'adhérence d'hématies à la surface d'une cellule étant vraisemblablement susceptible d'en modifier la membrane ; ce dernier point a été démontré avec différents ligands (2, 50). Les derniers travaux de POLLIACK et coll. (46) abondent dans ce sens.

Enfin, rien ne permet d'affirmer que les techniques usuelles d'isolement des lymphocytes, et en particulier celles mettant à profit le principe des gradients de densité, ne modifient pas l'architecture de la surface lymphocytaire.

Insistons à ce propos sur le fait que nous n'avons en aucun cas procédé à des isolements cellulaires, les échantillons étant recueillis par simple sédimentation.

4. LES LYMPHOCYTES "INTERMEDIAIRES"

Un élément supplémentaire incite à corréler la présence d'immunoglobulines et les microvillosités lymphocytaires : l'existence de lymphocytes "intermédiaires", peu villositaires et faiblement marqués.

Pour en rendre compte, on ne peut exclure formellement une redistribution spontanée des antigènes membranaires, préalable au recueil des cellules et à leur fixation, entrainant les microvillosités vers un pôle de la cellule échappant au plan de coupe. Cependant, l'examen d'un grand nombre de sections permet de constater la rareté de ce phénomène. Il existe donc vraisemblablement une sous-population de lymphocytes sanguins modérement villositaires, ce que montre également les études au microscope à balayage (46, 47).

La mise en évidence de faibles quantités d'immunoglobulines à la surface de ces lymphocytes milite en faveur de leur nature B, ce qui conduit à spéculer l'existence d'une transition "anatomique" entre les états lisse et villositaire. Ceci est à rapprocher de la transition "fonctionnelle" postulée par d'autres auteurs (21) devant la constatation de lymphocytes pourvus conjointement de marqueurs spécifiquement B ou T.

5. SIGNIFICATION FONCTIONNELLE DES MICROVILLOSITES

La signification des microvillosités est à établir.

Il est tentant à leur sujet de faire état de certaines propriétés des lymphocytes B dans la génèse desquelles la membrane joue probablement un rôle déterminant :

- mobilité électrophorétique (plus lente que celle des lymphocytes T (26),

- adhèrence à la laine de nylon et aux billes de verre (71, 30).

En accroissant la surface cellulaire, les microvillosités rendent compte de ces propriétés d'adhèrence. Il est remarquable que celles-ci soient, tout comme l'endocytose et le capping, inhibées par le froid et l'azide de sodium (30). En effet, ces procédures, qui affectent les activités énergo-dépendantes de la membrane, diminuent le nombre des microvillosités (63, 38).

D'autre part, l'existence de microvillosités concentrées à un pôle de la cellule (antérieurement à l'application de tout réactif) est à rapprocher de la formation de l'uropode (considérée comme mode de locomotion de la cellule (11).

Cet uropode est habituellement admis comme étant un élément caractéristique des lymphocytes T (55). Mais des données récentes suggèrent qu'une formation identique pourrait être élaborée par les lymphocytes B pour se déplacer, (après application d'anticorps anti-immunoglobuline par exemple) (66).

Les relations existant entre le dernier phénomène et le capping sont peu explicites (66). La présence de microvillosités sur le "manche de miroir" du lymphocyte B (Fig. 5) permet cependant de relier celles-ci aux deux phénomènes, dans lesquels elles jouent possiblement un rôle essentiel.

6. LEUCEMIE LYMPHOIDE CHRONIQUE

Nos constatations sont en agrément avec les expériences menées avec l'immunofluorescence indiquant que la plupart des leucémies lymphoides chroniques témoignent d'une accumulation monoclonale de lymphocytes B (49, 70).

Des variations dans l'intensité du marquage existent d'un patient à l'autre, mais elle est habituellement faible, ce qui reflète vraisemblablement la diminution de la quantité d'immunoglobulines présentes à la surface des lymphocytes malins par rapport aux lymphocytes normaux (70, 49, 65).

D'autre part, nous avons constamment remarqué des variations individuelles de la charge en immunoglobulines de surface entre cellules d'un même échantillon. Il est concevable que la prolifération cellulaire comporte une hétérogéneité de maturation indépendante du blocage terminal de celle-ci admis comme trouble fondamental (57).

Enfin, tout comme sur les lymphocytes B normaux existe une relation de proportionnalité entre l'intensité du marquage et le nombre de microvillosités lymphocytaires. Cependant, deux cas de leucémie lymphoide chronique présentent une proportion notable de cellules "blastiques" lisses pourvues d'une immunoglobuline de surface décelable.

L'existence de "lymphoblastes" circulants n'est pas rare au cours de la maladie. Il a déjà été démontré par immunofluorescence que ces cellules portent la même immunoglobuline de surface que l'ensemble des lymphocytes circulants en excès et appartiennent donc au clone pathologique. (49). Leur signification est peu claire. Une étude systématique de la maturation lymphocytaire comparant la présence d'immunoglobulines de surface à l'architecture membranaire apporterait sans doute des précisions essentielles.

7. SYNDROME DE SEZARY

Les cellules de Sézary examinées par notre méthode sont dépourvues d'immunoglobulines de surface. Différents travaux ont démontré que ces lymphocytes atypiques possédent les mêmes

propriétés de membrane que les cellules T (15, 73). L'absence d'immunoglobulines concerne tous les segments de la membrane cellulaire, y compris les segments villeux, ce qui constitue une autre exception à la relation générale établie par notre travail.

8. CELLULES CONTAMINANTES

Quelques granulocytes et monocytes présents dans les suspensions cellulaires étudiées ont un marquage membranaire.

Des récepteurs pour les immunoglobulines ont été mis en évidence à la surface de ces leucocytes (à l'occasion d'expériences menées sur cellules vivantes) (9, 32, 1, 41). On pourrait donc suggérer un marquage non spécifique en rapport avec la fixation in vitro des anticorps de lapin. Mais une telle éventualité est exclue ici, l'incubation des cellules avec des gamma globulines de lapin couplées à la péroxydase ne faisant apparaître aucun marquage.

Il faut alors discuter un marquage artéfactuel consécutif à la diffusion de la réaction enzymatique à distance des lymphocytes (41). Ceci n'est guère plausible : en effet, des monocytes marqués sont visibles à distance des lymphocytes B d'une part, et d'autre part, des monocytes ou des granulocytes en contact intime avec ces derniers sont dévolus de tout marquage (Fig. 7).

Nous admettons que ces marquages témoignent de la présence d'immunoglobulines adsorbées à la surface de ces leucocytes contaminants avant fixation, et ce d'autant plus qu'ils sont obtenus tant avec l'anti-gamma qu'avec l'anti-mu.

Il serait néanmoins surprenant que cette adsorption se soit produite in vivo, les immunoglobulines cytophiles s'éluant facilement au cours des lavages. Il est plus vraisemblable que l'adsorption se réalise in vitro à partir d'immunoglobulines libérées par les lymphocytes immédiatement avant leur fixation

C O N C L U S I O N

Le caractère microvillositaire de la surface plasmique est donc un nouveau marqueur spécifique des lymphocytes B humains circulants, sous réserve de précautions techniques consistant essentiellement en une fixation immédiate des cellules après leur recueil. La démonstration de la nature B de ces cellules est établie par la mise en évidence d'immunoglobulines de surface à l'aide d'anticorps monospécifiques couplés à la péroxydase.

Cette technique immuno-électronique apparaît donc susceptible d'apporter un grand nombre de précisions sur la morphologie et la physiologie lymphocytaires ; c'est pourquoi actuellement nous poursuivons des expériences dans ce sens, essentiellement dans deux directions :

1 - La poursuite de l'étude des syndromes lympho-prolifératifs et apparentés.

2 - L'étude des remaniements membranaires induits in vitro par l'application de ligands, en mettant à profit l'individualisation récente d'un nouveau marqueur des lymphocytes B chez l'homme, l'IgD de surface (56).

La possibilité de marquer simultanément ou séquentiellement deux antigènes membranaires indépendants (l'IgM et l'IgD) peut apporter des renseignements originaux sur les phénomènes mal connus que sont la redistribution membranaire des marqueurs et leur endocytose (63).

LEGENDE DES FIGURES

Figure 1. Lymphocyte microvillositaire du sang normal marqué par un anticorps anti IgM.
La flèche indique la section d'une microvillosité. Mi : Mitochondrie. X : 7250.

Figure 2. Lymphocyte lisse du sang normal, dépourvu de marquage. Mi : Mitochondrie .
Un monocyte contigu contenant des granulations riches en péroxydase endogène (flèche) est visible. X : 17 000.

Figure 3. Lymphocyte intermédiaire modérément villositaire et peu marqué du sang normal. X : 12 000.
Post coloration au citrate de plomb.

Figure 4. Lymphocyte B normal marqué par un anticorps anti-IgM. On remarque la concentration polaire des microvillosités, la membrane restante étant relativement plus lisse et moins marquée. N : noyau, Mi : Mitochondrie.
Un lymphocyte intermédiaire et un polynucléaire neutrophile sont visibles. Ce dernier contient des grains péroxydase +. Sa membrane n'est pas marquée. X: 12 000.

Figure 5. Lymphocyte en "manche de miroir". Le marquage par les anticorps anti-immunoglobuline est visible au niveau de l'uropode (flèches). Le monocyte voisin est également marqué. X : 12 000.

Figure 6. Couche leucocytaire au cours d'un syndrome de Sézary incubée avec des anticorps anti-immunoglobuline. La grande cellule centrale est un polynucléaire éosinophile avec la péroxydase endogène localisée dans les nombreux grains. N : noyau. Sa membrane n'est pas marquée. L : lymphocyte B microvillositaire sectionné à un pôle. S : cellule de Sézary pourvu de quelques microvillosités, mais sans immunoglobuline de surface décelable. E : érythrocyte. X: 8 000.

Figure 7. Lymphocyte B microvillositaire marqué par un anticorps anti-IgM. La membrane du monocyte contigu est dépourvue de marquage. Flèche : lysosome péroxydase +. X : 22 000.

Figure 8. Lymphocytes de leucémie lymphoide chronique. Toutes les cellules sont fortement marquées par les anticorps anti-IgM et ont une surface microvillositaire. Coupées tangentiellement, ils ont un aspect chevelu (flèche). X : 4 900.

Figure 9. Lymphocytes de leucémie lymphoide chronique après application d'anticorps anti-IgM. Les variations dans l'intensité du marquage sont à remarquer : présence de cellules faiblement marquées (flèche) et d'une cellule sans marquage. X : 6 400. Dans l'encart, fort grossissement d'un lymphocyte lisse porteur d'un marquage artéfactuel (application de peroxydase seule). Cette faible réaction est facile à discerner des marquages spécifiques. X : 16 000.

Figure 10. Lymphoblaste d'un sang de leucémie lymphoide chronique, marqué par un anticorps anti-IgM. Un grand nucléole est visible (Nu). La surface est lisse.

Figure 11. Thymocytes normaux. La membrane, lisse et régulière, n'est pas marquée.

R E F E R E N C E S

1. ABRAMSON (N.), GELFAND (E.W.), JANDL (J.H.), ROSEN (F.S.). The interaction between human monocytes and red cells. Specificity for IgG subclasses and IgG fragments. J. Exp. Med. (1970) 132, 1207.

2. ASHMANN (R.F.). Lymphocyte receptor movement induced by sheep erythrocyte binding. J. Immunol. (1973) 111, 212.

3. AUSTEN (K.F.), HUNSICKER (L.G.), WINTROUB (B.U.). Humoral amplification systems in inflammation ; in "Clinical Immunobiology", edited by Bach (F.H.) et Good (R.A.). Academic Press New York, 1972.

4. AVRAMEAS (S.). Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Immunochemistry (1969) 6, 43.

5. AVRAMEAS (S.), TERNINCK (T.). The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbants. Immunochemistry (1969) 6, 53.

6. AVRAMEAS (S.), TERNINCK (T.). Peroxidase labeled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration. Immunochemistry (1971) 8, 1175.

7. BACH (J.F.). Le thymus, organe clef de l'immunité. Nouv. Presse Médicale (1974) 3, 571.

8. BENTWICH (Z.), KUNKEL (H.G.). Specific properties of human B and T lymphocytes and alterations in disease. Tranplant. Rev. (1973) 16, 29.

9. BERKEN (A.), BENACERRAF (B.). Properties of antibodies cytophilic for macrophages. J. Exp. Med. (1966) 123, 119.

10. BESSIS (M.). Cellules du sang normal et pathologique. Masson Ed. Paris 1972.

11. BESSIS (M.), DEBUISFLEURY (A.). Les mouvements des leucocytes étudiés au microscope électronique à balayage. Nouv. Rev. Fr. Hémat. (1971) 11, 377.

12. BIBERFIELD (P.), BIBERFIELD (G.), PERLMANN (P.). Surface immunoglobulin light chain determinants on normal and PHA-stimulated human blood lymphocytes studied by immunofluorescence and electron microscopy. Exp. Cell Res. (1971) 66, 177.

13. BLOOM (B.R.), BENNETT (B.). Macrophages and delayed hypersensitivity. Sem. Hematol. (1970) 7, 215.

14. BRETTON (R.), TERNINCK (T.), AVRAMEAS (S.). Comparison of peroxidase and ferritin labeling of cell surface antigen. Exp. Cell Res. (1972) 71, 145.

15. BROUET (J.C.), FLANDRIN (G.), SELIGMANN (M.). Indications for the thymus derived nature of the proliferating cells in six patients with Sézary's syndrom. New Engl. J. Med. (1973) 289, 341.

16. BURNET (M.F.). Cellular Immunology. Cambridge University Press. Londres. 1971.

17. CLAMAN (H.N.), CHAPERON (E.A.), TRIPLETT (R.F.). Immunocompetence of transferred thymus marrow cell combinations. J. Immunol. (1966) 97, 828.

18. COOPER (M.D.), PEREY (D.Y.) Mc KNEALLY (M.F.) et coll. A mammalian equivalent of the avian bursa of Fabricius. Lancet (1966) 1, 1388.

19. CRADDOCK (C.G.), LONGMIRE (R.), Mc MILLAN (R.). Lymphocytes and the immune response. New Engl. J. Med. (1973), 285, 324.

20. DE PETRIS (S.), RAFF (M.C.). Normal distribution, patching and capping of lymphocyte surface immunoglobulin studied by electron microscopy. Nature New Biol. (1973) 241, 257.

21. DICKLER (H.B.), ADKINSON (N.F.), TERRY (W.D.). Evidence for individual human peripheral blood lymphocytes bearing both B and T cell markers. Nature (1974) 247, 213.

22. FELDMANN (M.), NOSSAL (G.J.V.). Tolerance, enhancement and the regulation of interactions between T cells, B cells and macrophages. Transplant. Rev. (1972) 13, 3.

23. FINE (J.M.), STEINBUCH (M.). A simple technique for the isolation of monoclonal IgG and IgA. Rev. Europ. Et. Clin. Biol. (1970) 15, 1115.

24. FROLAND (S.S.), NATVIG (J.B.). Identification of three different human lymphocyte populations by surface markers. Transplant. Rev. (1973) 16, 114.

25. GLICK (B.). The bursa of Fabricius and the development of immunologic competence in "The thymus in immunobiology". Harper and Row Editeurs, New York, 1964.

26. GOLDSTONE (A.H.), URBANIAK (S.J.), IRVINE (W.J.). Electrophoresis of lymphocytes from normal human subjects and patients with chronic lymphocytic leukemia. Clin. Exp. Immunol. (1974) 17, 113.

27. GONATAS (N.K.), ANTOINE (J.C.), STIEBER (A.), AVRAMEAS (S.). Surface immunoglobulins of thymus and lymph node cells demonstrated by the peroxydase coupling technique. Lab. Invest. (1972) 26, 253.

28. GOWANS (J.L.), Mc GREGOR (D.D.), COWEN (D.M.) et coll. Initiation of immune response by small lymphocytes. Nature (London) (1962) 196, 651.

29. GRAHAM (R.C.), KARNOVSKY (M.J.). The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney : ultrastructural cytochemistry by a new technique. J. Histochem. Cytochem. (1966) 14, 291.

30. GREAVES (M.F.), BROWN (G.). Purification of human T and B lymphocytes. J. Immunol. (1974) 112, 420.

31. HAMMERLING (U.), RAJEWSKY (K.). Evidence for surface associated immunoglobulin on T and B lymphocytes. Europ. J. Immunol. (1971) 1, 447.

32. HUBER (H.), POLLET (M.J.), LINDSCOTT (W.D.), FUDENBERG (H.H.), MULLER-EBERHARD (H.J.). Human monocytes : distinct receptor sites for the third component of complement and for immunoglobulins. Science (1968) 162, 1281.

33. JONDAL (M.), WIGZELL (H.), AIUTI (F.). Human lymphocyte subpopulations : classification according to surface markers and/or functional characteristics. Transplant. Rev. (1973) 16, 163.

34. KATZ (D.H.), BENACERRAF (B.). The regulatory influence of activated T cells on B cell response to antigen. Adv. Immunol. (1972) 15, 2.

35. KAY (M.M.), BELOHRADSKY (B.), YEE (K.), VOGEL (J.), BUTCHER (D.), WYBRAN (J.), FUDENBERG (H.H.). Cellular interactions : scanning electron microscopy of human thymus derived rosette forming lymphocytes. Clin. Immunol. Immunopath. (1974) 2, 301.

36. LELCHUCK (R.), PATRUCCO (A.), MANNI (J.A.). Studies of cellular immunity in Chagas' disease : effect of glutaraldehyde treated specific antigen on inhibition of leucocyte migration. J. Immunol. (1974) 112, 1578.

37. LIN (P.S.), COOPER (A.G.), WORTIS (H.H.). Scanning electron microscopy of human T cell and B cell rosettes. New Engl. J. Med. (1973) 289, 548.

38. LIN (P.S.), WALLACH (D.F.H.), TSAI (S.). Temperature induced variations in the surface to pology of cultured lymphocytes are revealed by scanning electron microscopy. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. (1973) 70, 2492.

38a. LUTZNER (M.A.), JORDAN (H.W.). The ultrastructure of an abnormal cell in Sézary's syndrom. Blood (1968) 31, 719.

39. MASSEYEFF (R.), GOMBERT (J.), JOSSELIN (J.). Méthode de préparation de la β-2 macroglobuline du sérum humain. Immunochemistry (1965) 2, 177.

40. MATTER (A.), LISOWSKA-BERNSTEIN (B.), RYSER (J.E.), LAMELIN (J.P.), VASSALI (P.). Mouse thymus-independant and thymus derived lymphoid cells. II. Ultrastructural studies. J. Exp. Med. (1972) 136, 1008.

41. MESSNER (R.P.), JECLINCK (J.). Receptors for human γG globulin on human neutrophils. J. Clin. Invest. (1970) 49, 2165.

42. MILLER (J.F.A.P.), MITCHELL (G.F.). Thymus and antigen reactive cells. Transplant. Rev. (1969) 1, 3.

43. MITCHISON (N.A.), TAYLOR (R.B.), RAJENSKY (K.). In "Developmental aspects of antibody formation and structure. J. Sterzl. Editeur. Prague. 1970.

44. NOSSAL (G.V.J.). The cellular and molecular basis of immunological tolerance. In "Essays in Fundamental Immunology." I. Roitt ed., Blackwell Scientif. Publ. Oxford. 1973.

45. PERKINS (W.D.), KARNOVSKY (M.J.), UNANUE (E.R.). An ultrastructural study of lymphocytes with surface bound immunoglobulin J. Exp. Med. (1972)135, 267.

46. POLLIACK (.A), FU (S.M.), DOUGLAS (S.D.), BENTWICH (Z.), LAMPEN (N.), DE HARVEN (E.). Scanning electron microscopy of human lymphocyte sheep erythrocyte rosettes. J. Exp. Med. (1974) 140, 146.

47. POLLIACK (A.), LAMPEN (N.), CLARSON (B.D.), DE HARVEN (E.), BENTWICH (Z.), KUNKEL (H.G.). Identification of human B and T lymphocytes by scanning electron microscopy. J. Exp. Med. (1973) 138, 607.

48. PREUD'HOMME (J.L.). Etude des immunoglobulines de surface des cellules lymphoides humaines. Thèse pour le Doctorat en Biologie humaine. Paris 1972.

49. PREUD'HOMME (J.L.), SELIGMANN (M.). Surface bound immunoglobulins as a cell marker in human lymphoproliferative diseases. Blood (1972) 40, 777.

50. REYES (F.), LE GO (A.), DELRIEU (F.), BACH (J.F.). Ultrastructure of cells binding immunoglobulin coated erythrocytes in rheumatoid arthritis. Clin. Exp. Immunol. (1974) 17, 533.

51. REYES (F.), LEJONC (J.L.), GOURDIN (M.F.). Travaux non publiés.

52. REYES (F.), LEJONC (J.L.), GOURDIN (M.F.), MANNONI (P.), DREYFUS (B.). Démonstration de la présence d'immunoglobulines de membrane sur les villosités des lymphocytes humains. C.R. Acad. Sc. Paris. Série D. (1974) 278, 2373.

53. REYES (F.), LEJONC (J.L.), GOURDIN (M.F.), MANNONI (P.), DREYFUS (B.). The surface morphology of human B lymphocytes as revealed by immunoelectron microscopy. J. Exp. Med. (1975) sous presse.

54. REYES (F.), LEJONC (J.L.), GOURDIN (M.F.), TONTHAT (H.), BRETON GORIUS (J.). Human normoblast A antigen seen by immunoelectron microscopy. Nature (1974) 247, 461.

55. ROSENTHAL (A.S.), DAVIE (J.M.), ROSENSTREICH (D.L.), CEHRS (K.V.). Antibody mediated internalisation of B lymphocyte surface membrane immunoglobulin. Exp. Cell Res. (1973) 81, 317.

56. ROWE (D.S.), HUGH (L.X.), FORNI (L.), PERNIS (B.). Immunoglobulin D as a lymphocyte receptor. J. Exp. Med. (1973) 138, 965.

57. SALMON (S.), SELIGMANN (M.). B-cell neoplasia in man. Lancet (1974) 2, 1230.

58. SANDERSON (C.J.), FROST (P.). The induction of tumour immunity in mice using glutaraldehyde treated tumour cells. Nature (1974) 248, 690.

59. SANTER (V.), BANKHURST (A.D.), NOSSAL (G.V.J.). Ultrastructural distribution of surface immunoglobulin determinants on mouse lymphoid cells. Exp. Cell Res. (1972) 72, 377.

60. SAPIN (C.), CONTET (A.), MASSEZ (A.), DRUET (P.). Isolement de l'IgA et l'IgM par chromatographie d'affinité à partir du sérum humain et de rat. Soumis pour publication au "Journal Immunological methods". 1975.

61. SELIGMANN (M.), FUDENBERG (H.H.), GOOD (R.A.). A proposed classification of primary immunologic deficiencies. Amer. J. Med. (1968) 45, 817.

62. SELIGMANN (M.), PREUD'HOMME (J.L.), BROUET (J.C.). B and T cell markers in human proliferative blood diseases and primary immuno deficiencies, with special reference to membrane bound immunoglobulins. Transpl. Rev. (1973) 16, 85.

63. SINGER (S.J.). Molecular biology of cellular membranes with applications to immunology. Adv. Immunol. (1974) 19, 1.

64. TAYLOR (R.B.), DUFFUS (N.P.), RAFF (M.C.), DE PETRIS (S.). Redistribution and pinocytosis of lymphocyte surface immunoglobulin molecules induced by anti-immunoglobulin antibody. Nature New Biol. (1971), 233, 225.

65. TERNINCK (T.), DIGHIERU (G.), FOLLEZOU (J.), BINET (J.L.). Comparison of normal and CLL surface Ig determinants using peroxidase labeled antibodies. I. Detection and quantification of light chains determinants. Blood (1974) 43, 789.

66. UNANUE (E.R.), AULT (K.A.), KARNOVSKY (M.J.). Ligand induced movement of lymphocyte surface macromolecules. IV. Stimulation of cell mobility by anti-Ig and lack of relationship to capping. J. Exp. Med. (1974), 139, 295.

67. UNANUE (E.R.), PERKINS (W.D.), KARNOVSKY (J.). Endocytosis by lymphocytes of complexes of anti-Ig with membrane bound Ig. J. Immunol. (1972) 108, 569.

68. VOISIN (G.A.). Immunity and tolerance : a unified concept. Cell. Immunol. (1971) 2, 670.

69. WILLINGHAM (M.C.), SPICER (S.S.), GRABER (C.D.). Immunocytologic labeling of calf and human lymphocyte surface antigens. Lab. Invest. (1971) 25, 211.

70. WILSON (J.D.), NOSSAL (G.V.J.). Identification of human T and B lymphocytes in normal peripheral blood and in chronic lymphocytic leukemia. Lancet (1971) 2, 788.

71. WISLOFF (F.), FROLAND (S.S.). Antibody dependant lymphocyte mediated cytotoxicity in man : no requirement for lymphocytes with membrane bound immunoglobulin. Scand. J. Immunol. (1973) 2, 151.

72. ZUCKER-FRANKLIN (D.). The ultrastructure of lymphocytes. Sem. Hematol. (1969), 6, 4.

73. ZUCKER-FRANKLIN (D.), MELTON (J.W.), QUAGLIATA (F.). Ultrastructural, immunologic and functional studies on Sezary cells : a neoplasic variant of thymus derived (T) lymphocytes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1974) 71, 1877

VU
et Permis d'imprimer

LE RECTEUR

M. CASEDEVALLE

VU,
Le Président de thèse

B. DREYFUS

VU,
LE DOYEN

M. RAPIN